

PCT/JP99/05527

日 本 国 特 許 庁

07.10.99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 NOV 1999

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年11月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第335151号

出 願 人

Applicant(s):

塩野義製薬株式会社

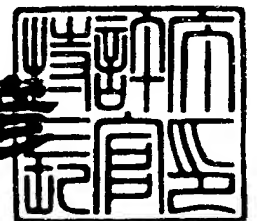
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3078034

【書類名】 特許願

【整理番号】 A005955

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成10年11月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 H L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法

【請求項の数】 16

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府高槻市西真上1-2-13-402

 【氏名】 森部 豊輝

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府茨木市天王2-5-J-1105

 【氏名】 兼重 俊彦

【特許出願人】

 【識別番号】 000001926

 【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100108970

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 山内 秀晃

 【電話番号】 06-455-2056

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044602

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9720909

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 HLAクラスⅠ対立遺伝子型の判別方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)～(d)の工程を含むHLAクラスⅠ対立遺伝子型の判別方法；

(a) HLAクラスⅠ抗原遺伝子またはその断片を含む核酸を鋳型として、

(1) 全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対を用いてPCR法を行い、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を非選択的に増幅する工程、または

(2) 特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対を用いてPCR法を行い、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程；

(b) 前記PCR法により得られた増幅産物を、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブをカルボキシル基修飾されたウェルに共有結合的に固相化したマイクロタイタープレートの該ウェルに加え、該増幅産物と固相化したDNAプローブとをハイブリダイズさせる工程（ここで該DNAプローブは前記増幅された特定のHLAクラスⅠ抗原遺伝子または特定のグループに応じて選択されている）；

(c) 前記増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する工程；

(d) 工程(c)で検出されたシグナルのパターンから、判定表に従ってHLAクラスⅠ対立遺伝子型を判別する工程。

【請求項2】 プライマー対の少なくとも一方が標識されたプライマーであることを特徴とする、請求項1記載のHLAクラスⅠ対立遺伝子型の判別方法。

【請求項 3】 PCR法により得られた増幅産物を固相化した DNA プローブにハイブリダイズさせると同時またはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて該増幅産物が固相化した DNA プローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出することを特徴とする、請求項 2 記載の HLA クラス I 対立遺伝子型の判別方法。

【請求項 4】 プライマー対の少なくとも一方がビオチンで標識されたプライマーであり、さらに PCR法により得られた増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートがストレプトアビジン酵素コンジュゲートであることを特徴とする、請求項 3 記載の HLA クラス I 対立遺伝子型の判別方法。

【請求項 5】 PCR法により得られた増幅産物と固相化した DNA プローブとのハイブリダイゼーション条件がホルムアミドを含む溶液中、37℃前後であることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の HLA クラス I 対立遺伝子型の判別方法。

【請求項 6】 PCR法により得られた増幅産物を固相化した DNA プローブにハイブリダイズさせた後の洗浄および／または該増幅産物の標識と酵素コンジュゲートとの結合反応後の洗浄の条件が室温であることを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の HLA クラス I 対立遺伝子型の判別方法。

【請求項 7】 少なくとも 1 つの特定の HLA-A 対立遺伝子、少なくとも 1 つの特定の HLA-B 対立遺伝子または少なくとも 1 つの特定の HLA-C 対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾された DNA プローブが、A98T (配列番号 1)、A98A (配列番号 2)、A160A (配列番号 3)、A239A (配列番号 4)、A238A (配列番号 5)、A240T (配列番号 6)、A257TC (配列番号 7)、A259AC (配列番号 8)、A270T (配列番号 9)、A282C (配列番号 10)、A290T (配列番号 11)、A299T (配列番号 12)、A302G (配列番号 13)、A355G (配列番号 14)、A362TA (配列番号 15)、A362TT (配列番号 16)、A368A (配列番号 17)、A368G (配列番号 18)、A368T (配列番号 19)、A402G (配列番号 20)、A423T (配列番号 21)、A448C (配列番号 22)、A485A (配列番号 23)、A524G (配列番号 24)、A526T (配列

番号25)、A527A(配列番号26)、A538CG(配列番号27)、A539A(配列番号28)、A539T(配列番号29)、A555T(配列番号30)、A559G(配列番号31)、A570CG(配列番号32)、A570GT(配列番号33)、A779A(配列番号34)、A843A(配列番号35)、BL1(配列番号36)、BL3(配列番号37)、BL4(配列番号38)、BL5(配列番号39)、BL9(配列番号40)、BL10(配列番号41)、BL11(配列番号42)、BL24(配列番号43)、BL25(配列番号44)、BL34(配列番号45)、BL35(配列番号46)、BL36(配列番号47)、BL37(配列番号48)、BL38(配列番号49)、BL39(配列番号50)、BL40(配列番号51)、BL41(配列番号52)、BL42(配列番号53)、BL56(配列番号54)、BL57(配列番号55)、BL78(配列番号56)、BL79(配列番号57)、BL222A(配列番号58)、BL272GA(配列番号59)、BL226G(配列番号60)、BL292G(配列番号61)、BL292T(配列番号62)、BL361G(配列番号63)、BL409T(配列番号64)、BL512T(配列番号65)、BL538CG(配列番号66)、BL538G(配列番号67)、CC(配列番号68)、A-1(配列番号69)、A-2(配列番号70)、A-3(配列番号71)、A-4(配列番号72)、A-52(配列番号73)、B-1(配列番号74)、B-2(配列番号75)、C-1(配列番号76)、C-22(配列番号77)、C-3(配列番号78)、C-42(配列番号79)、134-g(配列番号80)、134-A2(配列番号81)、353TCA(配列番号82)、343A-2(配列番号83)およびそれらの相補鎖、並びにそれらの末端配列に対し数塩基が欠失または付加した核酸から選ばれるものである、請求項1から6のいずれかに記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

【請求項8】 全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー、あるいは特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマーが、A2-5T(配列番号84)、A3-273T(配列番号85)、A4-8C(配列番号86)、A4-254G(配列番号87)、BASF-1(配列番号88)、BASR-1(配列番号89)、CGA011(配列番号90)、CGA012(配列番号91)、A3-241T(配列番号92)および3BCIn3-143(配列番号98)から選ばれるものである、請求項1から7のいずれ

かに記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

【請求項9】 A98T（配列番号1）、A98A（配列番号2）、A160A（配列番号3）、A239A（配列番号4）、A238A（配列番号5）、A240T（配列番号6）、A257TC（配列番号7）、A259AC（配列番号8）、A270T（配列番号9）、A282C（配列番号10）、A290T（配列番号11）、A299T（配列番号12）、A302G（配列番号13）、A355G（配列番号14）、A362TA（配列番号15）、A362TT（配列番号16）、A368A（配列番号17）、A368G（配列番号18）、A368T（配列番号19）、A402G（配列番号20）、A423T（配列番号21）、A448C（配列番号22）、A485A（配列番号23）、A524G（配列番号24）、A526T（配列番号25）、A527A（配列番号26）、A538CG（配列番号27）、A539A（配列番号28）、A539T（配列番号29）、A555T（配列番号30）、A559G（配列番号31）、A570CG（配列番号32）、A570GT（配列番号33）、A779A（配列番号34）、A843A（配列番号35）、BL1（配列番号36）、BL3（配列番号37）、BL4（配列番号38）、BL5（配列番号39）、BL9（配列番号40）、BL10（配列番号41）、BL11（配列番号42）、BL24（配列番号43）、BL25（配列番号44）、BL34（配列番号45）、BL35（配列番号46）、BL36（配列番号47）、BL37（配列番号48）、BL38（配列番号49）、BL39（配列番号50）、BL40（配列番号51）、BL41（配列番号52）、BL42（配列番号53）、BL56（配列番号54）、BL57（配列番号55）、BL78（配列番号56）、BL79（配列番号57）、BL222A（配列番号58）、BL272GA（配列番号59）、BL226G（配列番号60）、BL292G（配列番号61）、BL292T（配列番号62）、BL361G（配列番号63）、BL409T（配列番号64）、BL512T（配列番号65）、BL538CG（配列番号66）、BL538G（配列番号67）、CC（配列番号68）、A-1（配列番号69）、A-2（配列番号70）、A-3（配列番号71）、A-4（配列番号72）、A-52（配列番号73）、B-1（配列番号74）、B-2（配列番号75）、C-1（配列番号76）、C-22（配列番号77）、C-3（配列番号78）、C-42（配列番号79）、134-g（配列番号80）、134-A2（配列番号81）、353TCA（配列番号82）、343A-2（配列番号83）およびそれらの相補鎖、並びにそれらの末端配列に対し数塩基が欠失または付加した核酸から選ばれる、HLAクラスI対立遺伝子型の判別

方法に使用するためのDNAプローブ。

【請求項10】 BASF-1（配列番号88）、BASR-1（配列番号89）、CGA011（配列番号90）、CGA012（配列番号91）、A3-241T（配列番号92）および3BCIn3-143（配列番号98）から選ばれる、HLAクラスI対立遺伝子判別法に使用するためのプライマー。

【請求項11】 請求項1から8のいずれかに記載の方法に使用するための、HLAクラスI対立遺伝子型の判別のためのキット。

【請求項12】 請求項1から8のいずれかに記載の方法に使用するための、HLAクラスI対立遺伝子型の判別のための試薬。

【請求項13】 請求項9記載のDNAプローブを含む、HLAクラスI対立遺伝子型の判別のためのキット。

【請求項14】 請求項9記載のDNAプローブを含む、HLAクラスI対立遺伝子型の判別のための試薬。

【請求項15】 請求項10記載のプライマーを含む、HLAクラスI対立遺伝子型の判別のためのキット。

【請求項16】 請求項10記載のプライマーを含む、HLAクラスI対立遺伝子型の判別のための試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

ヒトの主要組織適合性抗原であるHLA（Human Leukocyte Antigen）は、免疫担当細胞の膜表面に発現し、抗原処理（antigen processing）された外因性および内因性抗原由来のペプチドをTリンパ球に提示すると共に、自己・非自己の識別マーカーとして機能している。本発明は、HLAクラスI対立遺伝子型の判別方法、その試薬およびキットに関するものであり、特に臨床医学領域の臓器移植の際のドナー・レシピエント間の適合性の判定や各種疾病との相関性解析などにおいて有用である。また、HLAクラスI対立遺伝子の検出および型判別の機械化が容易に可能である。

【0002】

【従来の技術】

H L A 抗原は、従来より、主にヒト同種抗体を用いた血清学的方法により、型判別が行われてきた。すなわち臍帯血や頻回輸血者の血清中に含まれる各 H L A 抗原型に対する特異抗体を用いて抗原抗体反応を行い、補体依存性の細胞障害を惹起させることで、陽性細胞は細胞膜の透過性に変化を来しエオジン色素などの取り込みにより、顕微鏡下で着色され膨化した形態として識別できる。この方法により、H L A クラス I 抗原である H L A - A、B、C 抗原および同クラス II 抗原である D R、D Q 抗原の型を識別することが可能であるが、これらの方法は特異抗体の採取と品質維持、および供給面に問題があった。また方法論的には細胞の生存を指標として判定するため、被検試料の状態の悪化、例えば疾病や採血後の経時的影響に起因する細胞生存率の低下などが検査成績の信頼性の低下の誘因になるという問題があった。

【0003】

近年分子生物学的技術の発展により、H L A 抗原をコードする遺伝子領域の解析に伴い各種の H L A 抗原型と遺伝子の塩基配列の対応性について知られるようになった。すなわち H L A 遺伝子の特定の遺伝子配列を調べることで、被検試料の H L A 抗原型を決定する（遺伝子タイピング）ことが可能となった。特に微細な塩基配列の変化を高感度に検出可能な技術である P C R (Polymerase Chain Reaction) 法は H L A クラス II 抗原遺伝子である D R、D Q、D P 遺伝子のタイピングに利用されている。これらの P C R 法を基盤とした H L A クラス II 遺伝子タイピングの技法として、P C R - S S O P (Sequence-Specific Oligonucleotide Probe) 法、P C R - R F L P (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法、P C R - S S P (Sequence-Specific Primer) 法、P C R - S S C P (Single Strand Conformation Polymorphism) 法などが開発されている。これらの技法は何れも解析の対象となる遺伝子領域を P C R 法で増幅し、その増幅産物を必要に応じてさらに別の技法を用いることにより、塩基配列の可変部位を解析して、遺伝子型を判別するものである。この H L A クラス II 遺伝子タイピングでは、従来のヒト同種血清を用いた血清学的方法による型分類に留まらず、

遺伝子レベルの型分類を可能にしている。すなわち、従来の血清学的方法では同一と考えられていた抗原が、遺伝子配列の違いによりさらに細分化され、本検査の臨床的意義の拡大をもたらしている。

【0004】

H L A クラス I I 遺伝子タイピングに比べ、P C R 法を利用したクラス I 遺伝子タイピングの実用化は著しく遅れている。これは、(1) クラス I I 遺伝子では、抗原特異性を反映したものを含め遺伝子変異(遺伝子置換)の多くが第2エクソン(exon)に集中しているのに対し、クラス I 遺伝子では第2~3エクソン、また一部は第4エクソンに散在している、(2) 非古典的遺伝子(H L A - E、F、G)および疑偽遺伝子(H L A - H、J、K、L)を含めH L A クラス I 遺伝子間の相同性が高い、などの理由である。

【0005】

これまでに、いくつかのH L A クラス I 遺伝子タイピング法が報告されているが何れも、操作の煩雑さ、反応条件の厳密さ、検体処理数の制限、精度の低さ、および各遺伝子に対するタイピング法の非統一性などの問題があり、さらに操作の熟練性も必要としている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来の血清学的方法によるH L A クラス I ローカス抗原タイピングの測定上の問題を解決し、従来法では識別分類が不可能であったH L A クラス I 抗原のサブタイプを遺伝子レベルで分類(all allele タイピング)可能にする方法およびそれに用いるキットや試薬を提供することである。さらに本発明の目的は、自動機械化が容易なH L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題に鑑み、鋭意研究した結果、全てのH L A - A 対立遺伝子、全てのH L A - B 対立遺伝子または全てのH L A - C 対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー、および特定のH L A - A 対立遺伝子群または特定の

H L A - B 対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマーを創意工夫して設定することができた。また、少なくとも1つの特定のH L A - A 対立遺伝子、少なくとも1つの特定のH L A - B 対立遺伝子または少なくとも1つの特定のH L A - C 対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なD N A プローブを創意工夫して設定することができた。そして、特定のH L A クラス I 対立遺伝子由来または特定のグループ由来のP C R 増幅産物をマイクロタイタープレートのウェルに固相化した前記D N A プローブにハイブリダイズさせると同時またはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて、該増幅産物が固相化したD N A プローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出することによりH L A クラス I の1種類の抗原あるいは対立遺伝子を判別することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は以下の(a)～(d)の工程を含むH L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法を主旨としたものである。

(a) H L A クラス I 抗原遺伝子またはその断片を含む核酸を鋳型として、

(1) 全てのH L A - A 対立遺伝子、全てのH L A - B 対立遺伝子または全てのH L A - C 対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対を用いてP C R 法を行い、全てのH L A - A 対立遺伝子、全てのH L A - B 対立遺伝子または全てのH L A - C 対立遺伝子を非選択的に増幅する工程、または

(2) 特定のH L A - A 対立遺伝子群または特定のH L A - B 対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対を用いてP C R 法を行い、各特定のグループ内のH L A - A 対立遺伝子群または特定のH L A - B 対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程；

(b) 前記P C R 法により得られた増幅産物を、少なくとも1つの特定のH L A - A 対立遺伝子、少なくとも1つの特定のH L A - B 対立遺伝子または少なくとも1つの特定のH L A - C 対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたD N A プローブをカルボキシル基修飾されたウ

エルに共有結合的に固相化したマイクロタイタープレートの該ウェルに加え、該増幅産物と固相化したDNAプローブとをハイブリダイズさせる工程（ここで該DNAプローブは前記増幅された特定のHLAクラスI抗原遺伝子または特定のグループに応じて選択されている）；

（c）前記増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する工程；

（d）工程（c）で検出されたシグナルのパターンから、判定表に従ってHLAクラスI対立遺伝子型を判別する工程。

【0009】

ここで上記工程（a）における目的遺伝子のPCR増幅は2つに分類することができる。1つは全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対を用いてPCR法を行い、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を非選択的に増幅する工程であり、また他の1つは特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対を用いてPCR法を行い、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程である。前者の工程では、PCRプライマーはHLA-A対立遺伝子、HLA-B対立遺伝子またはHLA-C対立遺伝子のいずれかに属する全ての各遺伝子の領域内またはそれを包含する前後の部分に共通な塩基配列に特異的であるよう設定する。後者の工程では、PCRプライマーは特定のグループを増幅するために、該特定のグループに含まれる全ての各遺伝子に共通な塩基配列に特異的であるように設定する。複数のグループの存在下である特定のグループを選択的に増幅する場合、該特定のグループに対応するプライマー対としてセンス（Sense）、アンチセンス（Antisense）の両方に必ずしも前記で設定するプライマーを用いる必要はなく、一方に該特定のグループに特異的なプライマーを用い、もう一方に全てのグループに特異的なプライマーを用いてもよい。本明細書ではHLA-A2抗原またはHLA-B40抗原をコードする遺伝子群をグループとして選択的

に増幅する方法が開示される。なお後者の工程については本発明者ら自身の文献 (Tissue Antigens 1997, Vol.50, 535-545) を参照すればよい。工程 (a) では HLA-A、B または C のいずれかに属する対立遺伝子由来または特定のグループ由来の PCR 増幅産物が産生されるのみであり、この段階では個々の HLA クラス I 対立遺伝子の型までは判別できない。従って、工程 (b) における特異的 DNA プローブによるハイブリダイゼーション反応を以後適用する。

【0010】

上記工程 (d) における判定表は、あらかじめ HLA クラス I 抗原あるいは対立遺伝子型が既知である試料の PCR 増幅産物を少なくとも 1 つの特定の HLA クラス I 対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な DNA プローブにハイブリダイズさせ、得られたシグナルをパターン化して作成する。当業者ならば、このような判定表は容易に作成できる。ここに、判定表としては例えば図 1～5 を参考にすればよい。本明細書にて使用している DNA プローブ以外の DNA プローブを使用する場合には別の判定表を使用すればよい。該別の判定表は、HLA クラス I 抗原あるいは対立遺伝子型が既知の試料の PCR 増幅産物を新たな DNA プローブにハイブリダイズさせ、得られたシグナルから作成すればよい。前記同様当業者ならば、このような判定表は容易に作成できる。なお判定表に従って HLA クラス I 対立遺伝子型を判別する際には、各被検試料が HLA クラス I 対立遺伝子の特定の型をホモ接合体またはヘテロ接合体で保有することに留意しなければならない。

【0011】

好ましい実施態様としては、上記工程 (c) において PCR 増幅産物が固相化した DNA プローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出するために、プライマー対の少なくとも一方が標識されたプライマーを用いて工程 (a) における PCR 法を行う。また別の態様として、4 種類のデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸 (dNTP) の内の少なくとも 1 種類が標識された dNTPs を用いて上記 PCR 法を行ってもよい。なお標識物質としては放射性、または非放射性、例えばビオチン、ジゴキシゲニンなどの物質が挙げられる。

【0012】

好ましい実施態様としては、上記工程（b）または（c）においてPCR法により得られた増幅産物を固相化したDNAプローブにハイブリダイズさせると同時にまたはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに工程（c）において該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて該増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する。例えば酵素コンジュゲートとしてストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシダーゼを用いる場合、該酵素コンジュゲートをハイブリダイゼーションと同時に添加しておき、洗浄後、直ちにシグナルを検出することができる。

【0013】

好ましい実施態様としては、上記工程（a）におけるプライマー対の少なくとも一方がビオチンで標識されたプライマーであり、さらに前記ビオチン標識と特異的に結合する工程（b）または（c）における酵素コンジュゲートがストレプトアビジン酵素コンジュゲート、例えばストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシダーゼまたはストレプトアビジンコンジュゲートアルカリフォスファターゼである。

【0014】

好ましい実施態様としては、上記工程（b）において、PCR法により得られた増幅産物と固相化したDNAプローブとのハイブリダイゼーション条件がホルムアミドを含む溶液中、37℃前後である。

【0015】

好ましい実施態様としては、上記工程（b）または（c）において、PCR法により得られた増幅産物を固相化したDNAプローブにハイブリダイズさせた後の洗浄および／または該増幅産物の標識と酵素コンジュゲートとの結合反応後の洗浄の条件が室温である。

【0016】

本発明の工程（b）における、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブ

としては、A98T（配列番号1）、A98A（配列番号2）、A160A（配列番号3）、A239A（配列番号4）、A238A（配列番号5）、A240T（配列番号6）、A257TC（配列番号7）、A259AC（配列番号8）、A270T（配列番号9）、A282C（配列番号10）、A290T（配列番号11）、A299T（配列番号12）、A302G（配列番号13）、A355G（配列番号14）、A362TA（配列番号15）、A362TT（配列番号16）、A368A（配列番号17）、A368G（配列番号18）、A368T（配列番号19）、A402G（配列番号20）、A423T（配列番号21）、A448C（配列番号22）、A485A（配列番号23）、A524G（配列番号24）、A526T（配列番号25）、A527A（配列番号26）、A538CG（配列番号27）、A539A（配列番号28）、A539T（配列番号29）、A555T（配列番号30）、A559G（配列番号31）、A570CG（配列番号32）、A570GT（配列番号33）、A779A（配列番号34）、A843A（配列番号35）およびそれらの相補鎖から選ぶことができる。また、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブとしては、A368T、A559G、BL1（配列番号36）、BL3（配列番号37）、BL4（配列番号38）、BL5（配列番号39）、BL9（配列番号40）、BL10（配列番号41）、BL11（配列番号42）、BL24（配列番号43）、BL25（配列番号44）、BL34（配列番号45）、BL35（配列番号46）、BL36（配列番号47）、BL37（配列番号48）、BL38（配列番号49）、BL39（配列番号50）、BL40（配列番号51）、BL41（配列番号52）、BL42（配列番号53）、BL56（配列番号54）、BL57（配列番号55）、BL78（配列番号56）、BL79（配列番号57）、BL222A（配列番号58）、BL272GA（配列番号59）、BL226G（配列番号60）、BL292G（配列番号61）、BL292T（配列番号62）、BL361G（配列番号63）、BL409T（配列番号64）、BL512T（配列番号65）、BL538CG（配列番号66）、BL538G（配列番号67）およびそれらの相補鎖から選ぶことができる。また、少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブとしては、CC（配列番号68）、A-1（配列番号69）、A-2（配列番号70）、A-3（配列番号71）、A-4（配列番号72）、A-52（配列番号73）、B-1（配列番号74）、B-2（配列番号75）、C-1（配列番号76）、C-22

(配列番号77)、C-3(配列番号78)、C-42(配列番号79)、134-g(配列番号80)、134-A2(配列番号81)、353TCA(配列番号82)、343A-2(配列番号83)およびそれらの相補鎖から選ぶことができる。なお本発明は、上記HLAクラスI対立遺伝子型の判別方法に使用するための少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブ(配列番号1～配列番号83)自身も含むものである。当業者ならば容易に理解できるように、前記DNAプローブは、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な範囲、すなわち該DNAプローブが本来有するハイブリダイゼーションの特異性を維持する範囲で、その末端配列に対し数塩基の欠失または付加を行うことができる。従って本発明のDNAプローブは、配列番号1～配列番号83の核酸配列に対し前記範囲で塩基の欠失または付加をしたDNAプローブも含むものである。

【0017】

本発明の工程(a)における、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマーとしては、CGA011(配列番号90)、CGA012(配列番号91)、A3-241T(配列番号92)および3BCIn3-143(配列番号98)から選ぶことができ、また特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマーとしては、A2-5T(配列番号84)、A3-273T(配列番号85)、A4-8C(配列番号86)、A4-254G(配列番号87)、BASF-1(配列番号88)およびBASR-1(配列番号89)から選ぶことができる。なお本発明は、上記HLAクラスI対立遺伝子判別法に使用するためのプライマー(配列番号88～配列番号92、配列番号98)自身も含むものである。

【0018】

HLA-A対立遺伝子、HLA-B対立遺伝子およびHLA-C対立遺伝子は

新規なものが次々と発見され、WHO（世界保健機構）のHLA命名委員会の報告書では1997年3月時点でそれぞれ、82種類、186種類、42種類の対立遺伝子の存在が知られている。本発明はこれらの全ての対立遺伝子を識別することが可能であるが、今後さらに発見・登録される対立遺伝子の識別についても本発明で示した方法、上記以外のDNAプローブまたはプライマーの追加などの容易な改変により対応することが可能である。

【0019】

また本発明は、本明細書記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法に使用するためのキット、試薬も提供することが可能である。さらに本発明は、本明細書記載のDNAプローブまたはプライマーを含むキット、試薬も提供することが可能である。該キットは、例えば本発明で開示されているプライマー（配列番号84～配列番号92）を含む溶液、PCR緩衝液（濃縮溶液でもよい）、dNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ、本発明で開示されているDNAプローブ（配列番号1～配列番号83）または該DNAプローブをウェルに共有結合的に固相化したマイクロタイタープレート、変性液、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄液および該キットの説明書（上記判定表を含む）により構成される。前記プライマーは放射性または非放射性の物質により標識されていても標識されていなくてもよく、プライマー対の形で構成されていてもよい。また該プライマーを含む溶液は凍結乾燥状態でもよい。なお前記プライマーが非標識の場合、4種類のdNTPの内の少なくとも1種類が標識されたdNTPsを用いる。標識に非放射性の物質を適用する場合、必要に応じて本発明で開示されている酵素コンジュゲート溶液、発色試薬（発色基質、発色液を含む）、発光試薬または蛍光試薬、停止液などを構成に加えてもよい。さらにゲノムDNAを単離するためのグアニジンチオシアネートバッファーなど、キットの構成は本発明の実施を促進する程度で任意に追加することができる。

【0020】

【本発明の実施の形態】

次に、上記本発明の手順をさらに詳細に説明する。

【0021】

本発明の判別方法は、以下の6段階に分けて説明することができる。すなわち、1) 染色体(ゲノム) DNAの抽出、2) 目的遺伝子のPCR増幅、3) マイクロタイタープレートのウェルへのDNAプローブの固相化、4) PCR増幅産物とDNAプローブのハイブリダイゼーション、5) シグナルの検出、6) 遺伝子型の判定、である。

【0022】

1) 染色体(ゲノム) DNAの抽出

以下にゲノムDNAの調製方法の一例を説明する。採取した血液より常法に従い白血球を分離し、これにグアニジンチオシアネートバッファーなどを加えて溶解させた後、フェノール抽出によりタンパク質を除去する。これに酢酸ナトリウム(pH 5.2)を添加し攪拌後、冷エタノールを添加してゲノムDNAを得る。

【0023】

2) 目的遺伝子のPCR増幅

上記DNAを鋳型として、HLAクラスI対立遺伝子を含む領域をPCR法により増幅する。前記増幅反応に用いる試薬は市販のものを使用することができ、添付の説明書の指示に従って行えばよいが、必要に応じ反応温度、時間、サイクル数などの条件を変えてもよい。このとき1反応チューブに1プライマー対を用いて増幅を行うが、該反応チューブに複数のプライマー対を入れて増幅させ、操作タスクや経費の削減を実現することができる。また本発明の目的から、実際の検査やキットでは、一方のプライマーがビオチンで標識されたプライマー対が用いられる。

【0024】

例えばHLA-A2対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、A2-5Tおよび5'末端をビオチンで標識したA3-273Tをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。またHLA-A対立遺伝子の第4エクソンを含む領域の増幅には、A4-8Cおよび5'末端をビオチン標識したA4-254Gをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。なお前記プライマーについては本発明者ら自身の文献(Tissue Antigens 1997、前出)を参照のこと

【0025】

例えばHLA-B40対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、BASF-1および5'末端をビオチンで標識したBASR-1をプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。

【0026】

例えば全てのHLA-A対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、CGA011、CGA012および5'末端をビオチンで標識したA3-241Tをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。

【0027】

例えば全てのHLA-B対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、5BIN1-TA（配列番号93）、5BIN1-CG（配列番号94）および5'末端をビオチンで標識した3BIN3-37（配列番号95）をプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。なお前記プライマーについてはCereb N.らの文献（Tissue Antigens 1997, Vol.50, 74-76）を参照のこと。

【0028】

例えばHLA-C対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、5CIn1-61（配列番号96）、5CIn1-612（配列番号97）および5'末端をビオチンで標識した3BCIn3-143をプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。なお前記プライマーについてはCereb N.らの文献（Tissue Antigens 1995, Vol.45, 1-11）を参照のこと。

【0029】

3) マイクロタイタープレートのウェルへのDNAプローブの固相化

少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブ（1～20 pmol）をポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾された各ウェルに添加し、適当な触媒、例えば1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）などを用いて化学的にアミド結合反応

を誘導し、両者を共有結合的に固相化する。該DNAプローブをウェルに固相化した後のマイクロタイタープレートは適当な緩衝液で洗浄する。なお洗浄後のマイクロタイタープレートは、湿潤冷蔵条件で長期保存が可能である。

【0030】

4) PCR増幅産物とDNAプローブのハイブリダイゼーション

上記PCR増幅産物は、例えばNaOHなどの強アルカリ存在下で変性して1本鎖DNAとした後、マイクロタイタープレートのウェルに固相化されたDNAプローブにハイブリダイズさせる。前記ハイブリダイズは、ホルムアミドを含む溶液中、37℃前後のハイブリダイゼーション条件で行う。そしてハイブリダイゼーション反応終了後、洗浄を行うことにより、過剰あるいは前記DNAプローブと特異的な塩基配列を持たない増幅産物を除去する。なおここで用いるDNAプローブは、上記で増幅された特定のHLAクラスI抗原遺伝子または特定のグループに応じて選択される。

【0031】

例えば上記A2-5TおよびA3-273Tのプライマー対によるHLA-A2対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物、あるいはA4-8CおよびA4-254Gのプライマー対によるHLA-A対立遺伝子の第4エクソンを含む領域の増幅産物には、A98T、A98A、A160A、A240T、A270T、A290T、A355G、A362TA、A362TT、A368A、A368G、A368T、A402G、A485A、A527A、A539A、A539T、A559G、A570CG、A779A、A843AをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

【0032】

例えば上記BASf-1およびBASR-1のプライマー対によるHLA-B40対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物には、A368T、BL4、BL5、BL24、BL25、BL34、BL35、BL37、BL39、BL41、BL56、BL57、BL222A、BL409T、BL512TをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

【0033】

例えば上記CGA011、CGA012およびA3-241Tのプライマー対による全てのHLA

—A対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物には、A239A、A238A、A240T、A257TC、A259AC、A282C、A290T、A299T、A302G、A423T、A448C、A524G、A526T、A538CG、A539A、A555T、A570CG、A570GTをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

【0034】

例えば上記5BIN1-TA、5BIN1-CGおよび3BIN3-37のプライマー対による全てのHLA-B対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物には、A368T、A559G、BL1、BL3、BL4、BL5、BL9、BL10、BL11、BL24、BL25、BL34、BL35、BL36、BL37、BL38、BL39、BL40、BL41、BL42、BL57、BL78、BL79、BL222A、BL272GA、BL226G、BL292G、BL292T、BL361G、BL512T、BL538CG、BL538GをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

【0035】

例えば上記5CIn1-61、5CIn1-612および3BCIn3-143のプライマー対によるHLA-C対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物には、CC、A-1、A-2、A-3、A-4、A-52、B-1、B-2、C-1、C-22、C-3、C-42、134-g、134-A2、353TCA、343A-2をDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

【0036】

5) シグナルの検出

以下にシグナルの検出の一例を説明する。DNAプローブとハイブリダイズしたPCR増幅産物はそれ自身が含有する標識、例えばビオチンなどを利用して検出する。すなわちビオチンに対し結合性を有するストレプトアビジンコンジュゲートアルカリフォスファターゼまたはストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシダーゼを上記マイクロタイタープレートの各ウェルに加えてシールなどにより蓋をし、適当な温度条件で放置して反応させる。そしてp-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) などの発色基質を用いて、ハイブリダイズした増幅遺伝子をシグナルとして検出する。シグナルの検出は吸光度測定などにより行う。なお前記シグナルは機械による自動検出も可能

であるが、発色による場合は肉眼によって容易に検出できる。

【0037】

6) 遺伝子型の判定

上記マイクロタイタープレートの検出されたシグナルのパターンから、例えば図1～5に開示される判定表に従ってHLAクラスI対立遺伝子型を判別する。なお前記図1～5の判定表は、必要に応じてそのパターンをアレンジして用いてもよい。

【0038】

【実施例】

次に、実際の既知試料を用いた実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではない。

【0039】

実施例1

HLA-A2対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約10ml）より常法に従い分離した白血球（試料1～4）に500 μ lのグアニジンチオシアネートバッファー（4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）を添加し攪拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNAを得た。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-A2対立遺伝子の型判定を行った。

【0040】

上記DNAを用い、A2-5Tおよび5'末端をビオチン標識したA3-273Tをプライマー対として、PCR法によりHLA-A2対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅を行った。また同様に、A4-8Cおよび5'末端をビオチン標識したA4-254Gをプライマー対として、PCR法によりHLA-A対立遺伝子の第4エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTM Antibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸（pH8.8

)は67mM、硫酸アンモニウムは16.6mM、塩化マグネシウムは1.5mM、ツイーン20は0.01%、dNTPsは200 μ M、プライマー対は1.7 μ Mになるように添加した組成液で、全量を80 μ lとして反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600 (パーキンエルマー社製)のPCR増幅装置を用い、変性(94°C)を2分行った後、変性25秒、アニーリング(70°C)45秒、DNA伸長(72°C)45秒の反応を5サイクル繰り返し、さらに変性25秒、アニーリング(65°C)50秒、DNA伸長(72°C)45秒の反応を36サイクル繰り返すことにより行った。

【0041】

5'末端をアミノ基修飾したDNAプローブ、A98T、A98A、A160A、A240T、A270T、A290T、A355G、A362TA、A362TT、A368A、A368G、A368T、A402G、A485A、A527A、A539A、A539T、A559G、A570CG、A779A、A843Aをポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを20ウェルで1検体分とし、図1に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続いて0.2M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で16時間放置した後、PBS緩衝液(7.5mMリン酸水素2カリウム、2.5mMリン酸2水素カリウム、0.15M塩化ナトリウム)で4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200 μ lずつ添加して37°Cで1時間放置した後、PBS緩衝液で4回洗浄した。

【0042】

マイクロタイタープレートの各ウェルにハイブリダイゼーションバッファーであるGMCバッファー(0.25Mリン酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホルムアミド)を100 μ lずつ添加して37°Cで5分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域から得られた増幅産物を72 μ l、並びに第4エクソンを含む領域から得られた増幅産物を8 μ lそれぞれ採取し、それらに等量の0.4N NaOHを加えて混和した後、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それらにそれぞれ1800 μ lまたは200 μ lのハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した(前者はウェル1か

ら18、後者はウェル19と20に添加した)。そしてマイクロタイタープレート
をシールにより蓋をして37℃で1時間放置した。

【0043】

ウェルの溶液を除去した後、2×SSC洗浄液(0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸3ナトリウム)で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液(0.2Mトリス塩酸(pH7.6)、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20)で1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン(GIBCO BRL社製)を100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37℃で45分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色基質液(4mg/ml PNPP(p-ニトロフェニルリン酸)、1mM塩化マグネシウム、10% ジエタノールアミン(pH9.8))を添加して37℃で30分間放置した。放置終了後、各ウェルに0.5M EDTAを25 μ lずつ添加して発色反応を停止させ、405nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度は表1に示される通りであった。陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。またこの結果を用いて、図1に示した判定表に従って各試料(1~4)のHLA-A2対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表1の最下段に示される通りであった。

【0044】

【表 1】

HLA-A2 対立遺伝子の型判定結果 (405nm 吸光度)

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
ウェル 1	1.894	1.907	2.049	1.849
2	1.675	1.744	0.116	1.210
3	0.265	0.294	2.050	0.198
4	0.077	0.212	0.038	0.065
5	0.282	0.261	0.052	0.202
6	1.655	0.084	1.768	1.406
7	0.047	1.871	0.038	1.589
8	1.952	1.971	1.974	1.127
9	0.267	0.280	0.380	0.232
10	0.299	0.344	0.326	0.227
11	0.199	0.212	0.229	0.140
12	0.194	0.265	0.263	0.229
13	0.118	0.104	0.105	0.112
14	0.027	0.019	0.026	0.048
15	0.171	0.176	0.169	0.108
16	1.956	1.971	1.877	1.344
17	0.024	0.024	0.030	0.030
18	0.040	0.027	0.050	0.064
19	0.020	0.021	0.034	0.041
20	0.025	0.049	0.038	0.045
HLA-A2 対 立遺伝子型	A*0201	A*0206	A*0207	A*0201/ 0206

【0045】

実施例 2

HLA-B40 対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液 (約10ml) より常法に従い分離した白血球 (試料 5 ~

8) に500 μ l のグアニジンチオシアネートバッファー (4 M グアニジンチオシアネート、25 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール) を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加し攪拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNAを得た。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-B 40対立遺伝子の型判定を行った。

【0046】

上記DNAを用い、BASF-1および5'末端をビオチン標識したBASF-1をプライマー対として、PCR法によりHLA-B 40対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTM Antibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸 (pH 8.8) は33.5 mM、硫酸アンモニウムは8.8 mM、塩化マグネシウムは1.5 mM、ツイーン20は0.005%、dNTPsは200 μ M、プライマー対は1.7 μ Mになるように添加した組成液で、全量を70 μ lとして反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600のPCR増幅装置を用い、変性 (94°C) を2分を行った後、変性25秒、アニーリング (70°C) 45秒、DNA伸長 (72°C) 45秒の反応を5サイクル繰り返し、さらに変性25秒、アニーリング (65°C) 50秒、DNA伸長 (72°C) 45秒の反応を36サイクル繰り返すことにより行った。

【0047】

5'末端をアミノ基修飾したDNAプローブ、A368T、BL4、BL5、BL24、BL25、BL34、BL35、BL37、BL39、BL41、BL56、BL57、BL222A、BL409T、BL512Tをポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを15ウェルで1検体分とし、図2に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続いて0.2 M EDC溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で16時間放置した後、PBS緩衝液 (7.5 mM リン酸水素2カリウム、2.5 mM リン酸2水素カリウム、0.15 M 塩化ナトリウム) で4回洗浄した。洗浄後、0.4 N NaOHを200 μ lずつ添加して37°Cで1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

【0048】

マイクロタイタープレートの各ウェルにGMCバッファー（0.25Mりん酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホルムアミド）を100 μ lずつ添加して37℃で5分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物60 μ lと等量の0.4N NaOHとを混和し、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それに1500 μ lのハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートにシールで蓋をして37℃で1時間放置した。

【0049】

ウェルの溶液を除去した後、2×SSC洗浄液（0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸3ナトリウム）で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液（0.2Mトリス塩酸（pH7.6）、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20）で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ベクターラボラトリーズ社製）を100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37℃に15分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色基質液（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）溶液：Kirkegaard & Perryラボラトリーズ社製）を添加して37℃で30分間放置した。放置終了後、各ウェルに1% SDSを100 μ lずつ添加して発色反応を停止させ、650nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度は下記表2に示される通りであった。陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。またこの結果を用いて、図2に示した判定表に従って各試料（5～8）のHLA-B40対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表2の最下段に示される通りであった。

【0050】

【表2】

HLA-B40対立遺伝子の型判定結果 (650nm 吸光度)

	試料5	試料6	試料7	試料8
ウェル 1	1.846	1.671	1.742	1.849
2	2.126	2.148	2.182	2.239
3	0.088	0.082	0.083	0.093
4	1.966	1.870	1.800	1.976
5	0.154	0.161	0.142	0.205
6	1.711	1.744	1.671	2.018
7	0.050	0.051	0.056	0.067
8	2.356	0.209	0.238	0.058
9	0.130	2.533	2.517	0.014
10	0.069	0.099	0.111	0.027
11	0.042	0.064	0.070	2.315
12	0.101	0.014	0.039	0.044
13	2.487	2.464	0.373	2.342
14	0.193	0.156	2.124	0.093
15	0.038	0.050	0.287	0.031
HLA-B40対 立遺伝子型	B*4001	B*4002	B*4003	B*4006

【0051】

実施例3

HLA-A抗原および対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約10ml）より常法に従い分離した白血球（試料9～13）に500 μ lのグアニジンチオシアネートバッファー（4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）を

添加し攪拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNAを得た。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-A抗原および対立遺伝子の型判定を行った。

【0052】

上記DNAを用い、CGA011およびCGA012および5'末端をビオチン標識したA3-241Tをプライマーとして、PCR法により全てのHLA-A対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸(pH8.8)は33.5mM、硫酸アンモニウムは8.8mM、塩化マグネシウムは1.5mM、ツイーン20は0.005%、dNTPsは200 μ M、プライマー対は1.7 μ M(但しCGA011とCGA012を4:1の割合で混合したものを使用した)になるように添加した組成液で、全量を80 μ lとして反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600のPCR増幅装置を用い、変性(94℃)を2分行った後、変性25秒、アニーリング(70℃)45秒、DNA伸長(72℃)45秒の反応を5サイクル繰り返し、さらに変性25秒、アニーリング(65℃)50秒、DNA伸長(72℃)45秒の反応を36サイクル繰り返すことにより行った。

【0053】

5'末端をアミノ基修飾したDNAプローブ、A239A、A238A、A240T、A257TC、A259AC、A282C、A290T、A299T、A302G、A423T、A448C、A524G、A526T、A538CG、A539A、A555T、A570CG、A570GTをポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを18ウェルで1検体分とし、図3に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続いて0.2M EDC溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で16時間放置した後、PBS緩衝液(7.5mMリン酸水素2カリウム、2.5mMリン酸2水素カリウム、0.15M塩化ナトリウム)で4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200 μ lずつ添加し37℃で1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

【0054】

マイクロタイタープレートの各ウェルにGMCバッファー（0.25Mりん酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホルムアミド）を100 μ lずつ添加して37℃で5分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物72 μ lと等量の0.4N NaOHとを混和し、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それに1800 μ lのハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートにシールにより蓋をして37℃で1時間放置した。

【0055】

ウェルの溶液を除去した後、2×SSC洗浄液（0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸3ナトリウム）で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液（0.2Mトリス塩酸（pH7.6）、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20）で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ベクターラボラトリーズ社製）を100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37℃に15分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色基質液（TMB溶液：Kirkegaard & Perryラボラトリーズ社製）を添加し、37℃で30分間放置した。放置終了後、各ウェルに1% SDSを100 μ lずつ添加して発色反応を停止させ、650nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度から陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。また、その結果より、図3に示した判定表に従って各試料（9～13）についてHLA-A抗原および対立遺伝子の型判定を行った。

【0056】

実施例4

HLA-B抗原および対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約10ml）より常法に従い分離した白血球（試料14～18）に500 μ lのグアニジンチオシアネートバッファー（4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）

を添加し攪拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNAを得た。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-B抗原および対立遺伝子の型判定を行った。

【0057】

上記DNAを用い、5BIN1-TA、5BIN1-CGおよび5'末端をビオチン標識した3BIN3-37をプライマー対として、PCR法により全てのHLA-B対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸 (pH8.8) は67mM、硫酸アンモニウムは16.6mM、塩化マグネシウムは1.5mM、ツイン20は0.01%、DMSOは10%、dNTPsは200 μ M、プライマー対は1.7 μ M (但し5BIN1-TAと5BIN1-CGを2:3の割合で混合したものを使用した) になるように添加した組成液で、全量を140 μ l (70 μ l \times 2本) として反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600のPCR増幅装置を用い、変性 (94 $^{\circ}$ C) を2分行った後、変性25秒、アニーリング (70 $^{\circ}$ C) 45秒、DNA伸長 (72 $^{\circ}$ C) 45秒の反応を5サイクル繰り返し、さらに変性25秒、アニーリング (65 $^{\circ}$ C) 50秒、DNA伸長 (72 $^{\circ}$ C) 45秒の反応を36サイクル繰り返すことにより行った。

【0058】

5'末端をアミノ基修飾したDNAプローブ、A368T、A559G、BL1、BL3、BL4、BL5、BL9、BL10、BL11、BL24、BL25、BL34、BL35、BL36、BL37、BL38、BL39、BL40、BL41、BL42、BL57、BL78、BL79、BL222A、BL272GA、BL226G、BL292G、BL292T、BL361G、BL512T、BL538CG、BL538Gをポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを32ウェルで1検体分とし、図4に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続いて0.2M EDC溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で16時間放置した後、PBS緩衝液 (7.5mMリン酸水素2カリウム、2.5mMリン酸2水素カリウム、0.15M塩化ナトリウム) で4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200 μ lずつ添加し37 $^{\circ}$ Cで1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

【0059】

マイクロタイタープレートの各ウェルにGMCバッファー（0.25Mりん酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホルムアミド）を100 μ lずつ添加して37℃で5分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物128 μ lと等量の0.4N NaOHとを混和し、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それに3200 μ lのハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37℃で1時間放置した。

【0060】

ウェルの溶液を除去した後、2×SSC洗浄液（0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸3ナトリウム）で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液（0.2Mトリス塩酸（pH7.6）、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20）で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ベクターラボラトリーズ社製）を100 μ lずつ添加した。マイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37℃に15分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色基質液（TMB溶液：Kirkegaard & Perryラボラトリーズ社製）を添加して37℃で30分間放置した。放置終了後、1% SDSを100 μ lずつ添加して発色反応を停止させ、650nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度から陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。また、その結果より、図4に示した判定表に従って各試料（14～18）についてHLA-B抗原および対立遺伝子の型判定を行った。

【0061】

実施例5

HLA-C対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約10ml）より常法に従い分離した白血球（試料19～22）に500 μ lのグアニジンチオシアネートバッファー（4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）

を添加し攪拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNAを得た。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-C対立遺伝子の型判定を行った。

【0062】

上記DNAを用い、5CIn1-61、5CIn1-612および5'末端をビオチン標識した3BCIn3-143をプライマー対として、PCR法によりHLA-C対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸 (pH8.8) は67mM、硫酸アンモニウムは16.6mM、塩化マグネシウムは1.5mM、ツイーン20は0.01%、dNTPsは200 μ M、プライマー対は1.7 μ Mになるように添加した組成液で、全量を70 μ lとして反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600のPCR増幅装置を用い、変性 (94°C) を2分行った後、変性25秒、アニーリング (70°C) 45秒、DNA伸長 (72°C) 45秒の反応を5サイクル繰り返し、さらに変性25秒、アニーリング (65°C) 50秒、DNA伸長 (72°C) 45秒の反応を36サイクル繰り返すことにより行った。

【0063】

5'末端をアミノ基修飾したDNAプローブ、CC、A-1、A-2、A-3、A-4、A-52、B-1、B-2、C-1、C-22、C-3、C-42、134-g、134-A2、353TCA、343A-2をポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを16ウェルで1検体分とし、図5に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続いて0.2M EDC溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で16時間放置した後、PBS緩衝液 (7.5mMリン酸水素2カリウム、2.5mMリン酸2水素カリウム、0.15M塩化ナトリウム) で4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200 μ lずつ添加して37°Cで1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

【0064】

マイクロタイタープレートの各ウェルにGMCバッファー (0.25Mリン酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、25%ホルムアミド) を100 μ lずつ添加して37°Cで5分間放置した後、各ウェルのバッファー

液を捨てた。またその間に、上記増幅産物 $64\mu\text{l}$ と等量の 0.4N NaOHとを混和し、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それに $1600\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートにシールにより蓋をして 37°C で1時間放置した。

【0065】

ウェルの溶液を除去した後、 $2\times\text{SSC}$ 洗浄液(0.3M 塩化ナトリウム、 0.03M クエン酸3ナトリウム)で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液(0.2M トリス塩酸($\text{pH}7.6$)、 0.5M 塩化ナトリウム、 0.5% ツイーン20)で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ベクターラボラトリーズ社製)を $100\mu\text{l}$ ずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートにシールにより蓋をして 37°C に15分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色基質液(TMB溶液: Kirkegaard & Perryラボラトリーズ社製)を添加して 37°C で30分間放置した。放置終了後、各ウェルに 1% SDSを $100\mu\text{l}$ ずつ添加して発色反応を停止させ、 650nm の吸光度を測定した。各配列の吸光度から陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。また、その結果より、図5に示した判定表に従って各試料(19~22)についてHLA-C対立遺伝子の型判定を行った。

【0066】

【発明の効果】

【0067】

本発明によれば、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対、あるいは特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対によるPCR増幅と、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な、マイクロタイタープレートのウェルに共有結合的に固相化したDNAプローブによるリバーズハイブリダイゼーション解析との組合わせにより、HLAクラスIの1種類の抗原あ

るいは対立遺伝子を判別することができるので、従来の血清学的方法によるHLAクラスIローカス抗原タイピングの測定上の問題を解決し、従来法では識別・分類が不可能であったクラスIローカス抗原あるいはそのサブタイプを遺伝子レベルで分類（アリルタイピング）することが可能になる。さらに、従来のHLAクラスI対立遺伝子タイピングにおける操作上や精度上の問題も同時に解決し、簡便かつ迅速に遺伝子タイピングを実施することが可能になる。すなわち本発明により、HLAクラスI対立遺伝子の検出および型判別の機械化および自動化が容易に可能となる。そして本発明はHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法、その試薬およびキットを提供するので、これらは臨床医学領域の臓器移植の際のドナー・レシピエント間の適合性の判定や各種疾病との相関性解析などにおいて有用となる。

【配列表】

<110> Shionogi & Co.,LTD.

<120> Method for typing HLA class I genes

<130> A005955

<160> 98

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A98T

<400> 1

AGGTATTTCT TCACATCCGT G

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A98A

<400> 2

AGGTATTTCT ACACCTCCGT

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A160A

<400> 3

TACGTGGACA ACACGCAGT

19

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A239A

<400> 4

CAGGAGGAGC CGGAG

15

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A238A

<400> 5

AGCAGGAGAG GCCTGAGT

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A240T

<400> 6

CAGGAGGGTC CGGAGTAT

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A257TC

<400> 7

TTGGGACCTG CAGACACG

18

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A259AC

<400> 8

GGGACCGGAA CACACGG

17

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A270T

<400> 9

GACACGGAAT GTGAAGGC

18

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A282C

<400> 10

TGAAGGCCCA CTCACAGACT

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A290T

<400> 11

ACTCACAGAT TGACCGAGTG

20

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A299T

<400> 12

CAGACTGACC GAGTGGAC

18

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A302G

<400> 13

CCGAGAGAGC CTGCCGA

17

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A355G

<400> 14

TCTCACACCG TCCAGAGG

18

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A362TA

<400> 15

CCGTCCAGAT GATGTATGG

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A362TT

<400> 16

CCCTCCAGAT GATGTTTGG

19

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A368A

<400> 17

GAGGATGTAT GGCTGC

16

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A368G

<400> 18

GAGGATGTGT GGCTGCG

17

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A368T

<400> 19

GAGGATGTTT GGCTGCG

17

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A402G

<400> 20

CGCTTCCTGC GCGGGT

16

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A423T

<400> 21

CAGGACGCTT ACGACGG

17

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A448C

<400> 22

CATCGCCCTG AACGAGGA

18

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A485A

<400> 23

GCGGACAAGG CAGCTC

16

<210> 24

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A524G

<400> 24

GCGGCCCGTG TGGCGG

16

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A526T

<400> 25

CGGCCCGTTG GCGGAG

17

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A527A

<400> 26

GCCCATGAGG CGGAG

15

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A538CG

<400> 27

GAGCAGCGGA GAGTC

15

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A539A

<400> 28

GAGCAGCAGA GAGCCT

16

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A539T

<400> 29

GGAGCAGTTG AGAGCCT

17

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A555T

<400> 30

CTACCTGGAT GGCACGTG

18

<210> 31

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A559G

<400> 31

TGGAGGGCGA GTGCGT

16

<210> 32

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A570CG

<400> 32

GCGTGGACGG GCTCCG

16

<210> 33

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A570GT

<400> 33

GCGTGGAGTG GCTCCG

16

<210> 34

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A779A

<400> 34

CAGGCCTGAA GGGGATG

17

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A843A

<400> 35

AGCAGAGATA AACCTGCCAT

20

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL1

<400> 36

TCCGAGGAAG GAGCCGC

17

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL3

<400> 37

ACACGGAACA TGAAGGCC

18

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL4

<400> 38

ACACAGATCT CCAAGACC

18

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL5

<400> 39

CACAGATCTT CAAGACCAA

19

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL9

<400> 40

GTCCGAGAGA GGAGCCGC

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL10

<400> 41

GATCTACAAG GCCCAGGC

18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL11

<400> 42

GAAGTACAAG CGCCAGGC

18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL24

<400> 43

GGACCGGGAG ACACAGAT

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL25

<400> 44

GACCGGAACA CACAGATC

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL34

<400> 45

GCGCGGCTAC TACAACCA

18

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL35

<400> 46

GCTCCGCTAC TACAACCAG

19

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL36

<400> 47

CCCTCCAGAA TATGTATGGC

20

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL37

<400> 48

CTCCAGAGCA TGTACGGCT

19

<210> 49

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL38

<400> 49

TCACACCCCTC CAGAGGATG

19

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL39

<400> 50

CGGGTCTCAC ATCATCCAGA

20

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL40

<400> 51

TCACACTTGG CAGAGGAT

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL41

<400> 52

TCACACTTGG CAGACGAT

18

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL42

<400> 53

CACCCTCCAG TGGATGTATG

20

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL56

<400> 54

GCGGGCATAA CCAGTACG

18

<210> 55

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL57

<400> 55

ATGACCAGTC CGCCTACGA

19

<210> 56

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL78

<400> 56

TGGAGGGCCT GTGCGTG

17

<210> 57

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL79

<400> 57

TGGAGGGCAC GTGCGTG

17

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL222A

<400> 58

CGGGCGCCAT GGATAGAG

18

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL272GA

<400> 59

ACAGATCTGC AAGACCAA

18

<210> 60

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL226G

<400> 60

CCGTGGGTGG AGCAGGA

17

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL292G

<400> 61

GCACAGACTG ACCGAGAG

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL292T

<400> 62

CACAGACTTA CCGAGAGA

18

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL361G

<400> 63

ATCATCCAGG TGATGTATGG

20

<210> 64

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL409T

<400> 64

CCGCGGGTAT GACCAGT

17

<210> 65

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL512T

<400> 65

CGCAAGTTGG AGGCG

15

<210> 66

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL538CG

<400> 66

GGAGCAGCGG AGAGCC

16

<210> 67

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe BL538G

<400> 67

GGAGCAGGAC AGAGCCT

17

<210> 68

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe CC

<400> 68

TGGGTGGAGC AGGAGG

16

<210> 69

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A-1

<400> 69

ATGAAGTATT TCTTCACATC CG

22

<210> 70

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A-2

<400> 70

CTACACCGCC TGTGTCCCG

19

<210> 71

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A-3

<400> 71

ATGAGGTATT TCTCCACATC CG

22

<210> 72

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A-4

<400> 72

TGAGGTATTT CGACACCGC

19

<210> 73

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe A-52

<400> 73

ATTCTACAC CGCCGTGTC

19

<210> 74

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe B-1

<400> 74

CCGAGTGAAC CTGCCGAA

18

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe B-2

<400> 75

CCGAGTGAGC CTGCGGAA

18

<210> 76

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe C-1

<400> 76

CGGAGCAGCG GAGAGCC

17

<210> 77

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe C-22

<400> 77

GGAGCAGTGG AGAGCC

16

<210> 78

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe C-3

<400> 78

CGGAGCAGGC TGAGAGCCT

19

<210> 79

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe C-42

<400> 79

GGAGCAGCAG AGAGCCT

17

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe 134-g

<400> 80

GRGAGCCCCG CTTCATCG

18

<210> 81

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe 134-A2

<400> 81

GRGAGCCCCA CTTCATCGC

19

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe 353TCA

<400> 82

GTCTCACATC ATCCAGAGG

19

<210> 83

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe 343A-2

<400> 83

CGAGGCCAGT GAGTGA

16

<210> 84

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer A2-5T

<400> 84

CTCCTCGTCC CCAGGCTCT

19

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer A3-273T

<400> 85

GTGGCCCCCTG GTACCCGT

18

<210> 86

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer A4-8C

<400> 86

TCCYGWCAGA CSCCCCC

17

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer A4-254G

<400> 87

CTCAGGGTGA GGGGCTTG

18

<210> 88

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BASF-1

<400> 88

CCGCGAGTCC GAGGAA

16

<210> 89

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer BASR-1

<400> 89

GCCACTCCAC GCACTC

16

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer CGA011

<400> 90

CCGAACCCTC CTCCTGCTA

19

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer CGA012

<400> 91

CCGAACCCTC GTCCTGCTA

19

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer A3-241T

<400> 92

TCCTTCCCGT TCTCCAGGT

19

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 5BIN1-TA

<400> 93

GGCGGGGGCG CAGGACCTGA

20

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 5BIN1-CG

<400> 94

CGGGGGCGCA GGACCCGG

18

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 3BIN3-37

<400> 95

AGGCCATCCC CGSCGACCTA T

21

<210> 96

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 5Cln1-61

<400> 96

AGCGAGGKGC CCGCCCGGCG A

21

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 5CIn1-612

<400> 97

AGCGAGGKGC CCTCCCGGCG A

21

<210> 98

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 3BCIn3-143

<400> 98

GGAAACTCAG GAAAACTCAT SCC

23

【図面の簡単な説明】

【図1】 HLA-A 2 対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-A 2 対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

【図2】 HLA-B 40 対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-B 40 対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

【図3】 HLA-A 抗原あるいは対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-A 抗原あるいは対立遺伝子型を図左部に示す。

す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

【図4】 HLA-B抗原あるいは対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-B抗原あるいは対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

【図5】 HLA-C対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-C対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

【書類名】 図面

【図 1】

HLA-A 2 DNA Typing / High Resolution

plate number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	plate number
		A				B		C				D							E		
HLA-A allele	PC	1	2	3	4	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	1	2	HLA A allele
A*0220																					A*0220
A*0211																					A*0211
A*0216																					A*0216
A*0209																					A*0209
A*0201																					A*0201
A*0213																					A*0213
A*0219																					A*0219
A*0212																					A*0212
A*0202																					A*0202
A*0203																					A*0203
A*0214																					A*0214
A*0221																					A*0221
A*0206																					A*0206
A*0208																					A*0208
A*0205																					A*0205
A*0218																					A*0218
A*0215N																					A*0215N
A*0207																					A*0207
A*0210																					A*0210
A*0204																					A*0204
A*0217																					A*0217

【図 2】

HLA-B40(60,61) DNA Typing / High Resolution

plate number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	plate number
HLA-B allele	PC	A		B		C		D				E				HLA-B allele
		1	2	1	2	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4	
B*4001																B*4001
B*4002																B*4002
B*4003																B*4003
B*4009																B*4009
B*4702																B*4702
B*4004																B*4004
B*4006																B*4006
B*4007																B*4007
B*4008																B*4008
B*4701																B*4701

【図 3】

HLA-A DNA Typing / Medium Resolution

plate number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	plate number
	A		B			C				D						E			
HLA-A Locus	1	2	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	1	2	3	HLA-A Locus
A23																			A23
A80																			A80
A1																			A1
A24																			A24
A*2406																			A*2406
A*2407																			A*2407
A*3002-3004																			A*3002-3004
A*0212-0213-0219																			A*0212-0213-0219
A2																			A2
A43																			A43
A25																			A25
A26																			A26
A32																			A32
A36																			A36
A*3003																			A*3003
A*2403																			A*2403
A74																			A74
A31																			A31
A33																			A33
A*3001																			A*3001
A34-66																			A34-66
A28																			A28
A11																			A11
A*0302																			A*0302
A*0301																			A*0301
A29																			A29

【图 4】

HLA-B DNA Typing / Medium Resolution

[illegible]

【図 5】

HLA-C DNA Typing / Medium Resolution

plate number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	plate number
HLA-C allele	PC	A					B		C				D		E		HLA-C allele
		1	2	3	4	5	1	2	1	2	3	4	1	2	1	2	
Cw*0102-0103																	Cw*0102-0103
Cw*0202																	Cw*0202
Cw*0403																	Cw*0403
Cw*15																	Cw*15
Cw*0302																	Cw*0302
Cw*0303																	Cw*0303
Cw*0304																	Cw*0304
Cw*0401																	Cw*0401
Cw*0402																	Cw*0402
Cw*1402																	Cw*1402
Cw*1403																	Cw*1403
Cw*1801-1802																	Cw*1801-1802
Cw*0602																	Cw*0602
Cw*0707																	Cw*0707
Cw*0701-0702-0703-																	Cw*0701-0702-0703-
Cw*0704																	Cw*0704
Cw*0501																	Cw*0501
Cw*1204																	Cw*1204
Cw*1701-1702																	Cw*1701-1702
Cw*1602																	Cw*1602
Cw*0802																	Cw*0802
Cw*1202-1203																	Cw*1202-1203
Cw*1301																	Cw*1301
Cw*0801-0803																	Cw*0801-0803
Cw*1601																	Cw*1601

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

H L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法、そのキットおよび試薬を提供する。

【解決手段】

全ての H L A - A 対立遺伝子、全ての H L A - B 対立遺伝子または全ての H L A - C 対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対、あるいは特定の H L A - A 対立遺伝子群または特定の H L A - B 対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対による P C R 増幅と、少なくとも1つの特定の H L A - A 対立遺伝子、少なくとも1つの特定の H L A - B 対立遺伝子または少なくとも1つの特定の H L A - C 対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な、マイクロタイタープレートのウェルに共有結合的に固相化した D N A プローブによるリバーサハイブリダイゼーション解析との組合わせにより、H L A クラス I の1種類の抗原あるいは対立遺伝子を判別する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001926]

1. 変更年月日 1990年 8月23日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
氏 名 塩野義製薬株式会社